

US Patent Application based on PCT/EP2004/006800

"SAMPLE HOLDING DEVICE AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF"

Summary of DE 198 26 350

DE 198 26 350 discloses a process for preserving blood cells like erythrozyts by storage at low temperatures, wherein the blood cells are subjected to an increased hydro-static pressure.

DE 198 26 350 represents technological background with regard to cryopreservation methods. A sample receiving device as claimed in the above U.S. patent application is not disclosed in DE 198 26 350.



⑩ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 26 350 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
A 01 N 1/02

⑳ Aktenzeichen: 198 26 350.3
㉔ Anmeldetag: 12. 6. 98
㉔ Offenlegungstag: 23. 12. 99

DE 198 26 350 A 1

㉑ **Anmelder:**
Schmid-Schönbein, Holger, Prof. Dr.med., 52146
Würselen, DE

㉒ **Vertreter:**
Biermann, W., Dr.-Ing., Pat.-Ass., 52066 Aachen

㉓ **Erfinder:**
gleich Anmelder

⑤⑥ **Entgegenhaltungen:**
Ch.Körper u.a. in W.Mempel u.a. (Hrsg.), Tiefkühl-
konservierung von Blut, Vorträge der 1. Informati-
onstagung über Tiefkühlkonservierung von Blut am
30.4.88 in München, AV-Kommunikation und
Medizin-
verlag München 1989, S.48-51;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Verfahren und Vorrichtung zum Konservieren von zellulären Blutkomponenten**

⑤⑦ Zur Konservierung von zellulären, gegen Gefriervor-
gänge empfindlichen Blutzellen, insbesondere von Ery-
throzyten, werden die Blutzellen nach ihrer Abtrennung
vom Blut in einer wäßrigen Konservierungsflüssigkeit ei-
nem hohen hydrostatischen Druck ausgesetzt, unter die-
sem Druck auf eine Temperatur von weniger als 263 Kel-
vin abgekühlt und unter diesem Druck bei tiefer Tempera-
tur gelagert. Unter der Wirkung des hohen hydrosta-
tischen Drucks wird der Gefrierpunkt des Wassers in den
Zellen und in der Konservierungslösung stark erniedrigt.
Dadurch wird die Bildung von die Zellen und die Zellwän-
de schädigenden Eiskristallen verhindert. Durch Einstel-
lung geeigneter Ionenkonzentrationen von Na⁺, K⁺ und
Ca⁺⁺ werden physikochemische Alterungsreaktionen in
den Blutzellen weiter vermindert. Im Vergleich zu bekann-
ten Konservierungsverfahren bei beispielsweise Erythro-
zyten kann die Konservierungszeit durch das erfindungs-
gemäße Verfahren mindestens um den Faktor 10 erhöht
werden.

DE 198 26 350 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Konservieren von zellulären Blutkomponenten, insbesondere von Erythrozyten, durch Lagerung bei tiefen Temperaturen, sowie Vorrichtungen zur Durchführung des Verfahrens.

Zelluläre Blutkomponenten werden bekanntlich durch Gefriervorgänge irreversibel geschädigt. Die Lagerung von Blutbestandteilen in sogenannten Blutbanken erfolgt deshalb in der Weise, daß das zu konservierende Blut durch Zusatz einer Stabilisierungslösung ungerinnbar gemacht, das Blutplasma durch Zentrifugierung von den zellulären Blutkomponenten abgetrennt und Blutplasma und zelluläre Blutkomponenten getrennt konserviert werden. Das Blutplasma wird als tiefgefrorene Flüssigkeit gelagert. Die biochemischen, physikochemischen und enzymologischen Eigenschaften des Blutplasmas werden durch den Gefriervorgang nicht verändert, und das zu einem Eisblock schockgefrorene Blutplasma kann auf diese Weise beliebig lange gelagert werden.

Bei zellulären Blutbestandteilen liegen die Verhältnisse anders. Thrombozyten z. B., die für die Blutgerinnung verantwortlich sind, können bis heute nur in frischem Zustand erfolgreich transfundiert werden. Kühlsschritte, bei denen es zur Bildung von Eiskristallen innerhalb und/oder außerhalb der Blutzellen kommt, zerstören oder schädigen in erheblichem Maße die Zellwände und die Zellen und müssen daher auf jeden Fall vermieden werden. Eine beschränkte Konservierung läßt sich nur durch Lagerung in geeigneten Stabilisierungslösungen erreichen. Insbesondere die Erythrozyten, die die an Masse wichtigste Komponente des Blutes darstellen, sind gegen intrazelluläre Eisbildung sehr empfindlich. Eine Tiefkühlung ist nur dann möglich, wenn durch geeignete Zusätze der Gefrierpunkt gesenkt wird. Doch auch bei Tiefkühlung unter Zusatz von den Gefrierpunkt erniedrigenden Stoffen ist eine Konservierung nur in sehr beschränktem Umfang möglich. Offensichtlich kommt es nämlich bei den hierfür bekannten Verfahren ebenfalls zu Schädigungen der Zellen und vor allem der Zellmembranen, wodurch die Überlebensfähigkeit der Erythrozyten beeinträchtigt wird.

Weißer Blutkörperchen, die für die Infektabwehr des Blutes zuständig sind, sind hingegen überraschenderweise resistenter gegen intrazelluläre Eisbildung als andere Blutzellen.

Aus den genannten Gründen ist es bis heute nicht möglich, die gegen Eisbildung empfindlichen zellulären Blutkomponenten so zu konservieren, daß ihre biochemische Aktivität auch über längere Zeiträume voll erhalten bleibt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Konservierung von zellulären Blutkomponenten zu entwickeln, das es ermöglicht, diese Blutkomponenten auch über verhältnismäßig lange Zeiträume zu lagern, ohne daß die Zellen oder die Zellmembranen in wesentlichem Umfang geschädigt werden.

Gemäß der Erfindung wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die zellulären Blutkomponenten nach ihrer Abtrennung vom Blut in einer wässrigen Konservierungslösung einem hohen hydrostatischen Druck ausgesetzt, unter diesem Druck auf eine Temperatur von weniger als 263 Kelvin abgekühlt und unter diesem Druck und bei dieser Temperatur gelagert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren macht sich das "Le-Chatelier-Prinzip" zunutze, wonach das Gleichgewicht eines unter äußeren Einflüssen stehenden Systems sich stets in Richtung des kleinsten Zwanges verschiebt. Da Wasser unterhalb von 4 Grad C und Eis aufgrund ihres anomalen Wärmeausdehnungsverhaltens mit abnehmender Temperatur ihr Volumen vergrößern, führt die Anwendung von hohen hy-

drostatischen Drücken dazu, daß das Phasengleichgewicht Wasser-Eis, das heißt der Gefrierpunkt des Wassers, mit zunehmendem Druck sich zu tieferen Temperaturen verschiebt. Es ist anzunehmen, daß mit zunehmendem hydrostatischen Druck auch die Keimbildung von Eiskristallen zu tieferen Temperaturen verschoben wird. Das hat zur Folge, daß unter hohen hydrostatischen Drücken die Temperatur der Blutzellen-Suspension stark herabgesetzt werden kann, ohne daß die Gefahr einer Eisbildung und der damit einhergehenden Schädigung und Zerstörung der Zellmembranen besteht. Auf diese Weise ist es also möglich, nunmehr auch für zelluläre Blutkomponenten die Tiefkühlkonservierung anzuwenden, und zwar bis zu derart tiefen Temperaturen, bei denen Diffusionsvorgänge und Ionenbewegungen nur noch in sehr eingeschränktem Umfang möglich sind. Auf diese Weise kann die Konservierungszeit gegenüber den bekannten Verfahren erheblich gesteigert werden. Insbesondere hat es sich gezeigt, daß in den auf diese Weise extrem unterkühlten Erythrozyten alle ATP (Adenosintriphosphat) verbrauchenden Prozesse auf ein Minimum reduziert werden. Damit bleibt das in den Zellen akkumulierte Mg-ATP für die Zellen verfügbar, auch wenn über längere Zeiten keine nennenswerte Neusynthese erfolgt.

In zweckmäßiger Weiterbildung des Verfahrens werden die zellulären Blutkomponenten in wässrigen Konservierungslösungen suspendiert, die Na⁺-, K⁺- und Ca⁺⁺-Ionen in Konzentrationen enthalten, die transmembranale Ionenflüsse zwischen den Blutzellen und der Konservierungslösung praktisch ausschließen. Um die Diffusion von Na⁺- und Ca⁺⁺-Ionen in die Blutzellen zu verhindern, werden deshalb für diese Ionen in der Konservierungslösung Konzentrationen gewählt, die weit unter der natürlichen Konzentration dieser Ionen im Blut liegen. Die natürliche Konzentration dieser Ionen außerhalb der Blutzellen liegt bei etwa 150 mMol/l für Na⁺ und bei etwa 3000 µMol/l für Ca⁺⁺, während die Konzentration dieser Ionen innerhalb der Zellen bei 5 mMol/l für Na⁺ und bei 1 µMol/l für Ca⁺⁺ liegt. In der erfindungsgemäß verwendeten Konservierungslösung wird deshalb die Ionenkonzentration von Na⁺ und Ca⁺⁺ etwa auf diese natürliche intrazelluläre Konzentration dieser Ionen eingestellt.

Andererseits ist es zweckmäßig, die Diffusion von K⁺ aus den Blutzellen in die Konservierungslösung dadurch zu minimieren, daß der K⁺-Gehalt der wässrigen Konservierungslösung auf Werte von über 120 mMol/l gesteigert wird. Nach der Renormalisierung des Zellkonzentrats wird zur Herstellung eines transfusionsfähigen Gemischs durch Zugabe von K⁺-freien Lösungen die K⁺-Konzentration wieder auf etwa 6 mMol/l gesenkt, d. h. auf etwa physiologische Werte.

Die Eindiffusion von Ca⁺⁺ in die Blutzellen kann auch dadurch verringert oder verhindert werden, daß der Konservierungslösung Citrat oder ein anderer Komplexbildner für Ca⁺⁺ zugegeben wird.

Auch diese Maßnahme dient dazu, die Gesamtheit von Membran-Lipiden und Membran-Proteinen zu schützen und möglichst unverändert zu erhalten.

Eine weitere günstige Beeinflussung der Konservierung der Blutzellen kann durch Zugabe bestimmter Medikamente zu der Konservierungslösung erfolgen. Beispielsweise können zu diesem Zweck Chloprolazin (Chloroquin-bis(Dihydrogenphosphat)) oder ähnlich wirkende Substanzen sowie übliche Lokalanästhetika zugegeben werden. Die Wirkung solcher Substanzen beruht darauf, daß sie die sogenannte "echinozytogene" Reaktion verhindern bzw. umkehren. Unter echinozytogener Reaktion wird eine Formänderung der normalerweise bikonkav geformten Erythrozyten unter Bildung von mehr oder weniger scharf gerundeten Vorstülpun-

gen der Zellmembran verstanden. Diese Formänderung führt zu einer Versteifung der Erythrozyten mit der Folge, daß ihre Fähigkeit, Engstellen des Gefäßsystems zu passieren, gestört wird. Schließlich führt sie zur Zerstörung der Zellen. Als Folge dessen können sich sogenannte Neoantigene bilden, die ihrerseits Anlaß zu schädlichen immunologischen Reaktionen mit dem Immunsystem des Empfängerblutes sein können.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann grundsätzlich mit Hilfe von bekannten Druckgefäßen durchgeführt werden, in denen der Überdruck während der gesamten Konservierungszeit bei tiefen Temperaturen aufrechterhalten bleibt.

Eine besonders geeignete Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, daß der Druckbehälter als solcher mit einer Druckkontrolleinrichtung versehen ist, die die Überwachung des Überdrucks während der Konservierungszeit gestattet. Präzise Meßinstrumente sind hierfür nicht erforderlich, vielmehr genügen in der Regel einfache Kontrollvorrichtungen. Als solche kommen beispielsweise transparente kleinkumige Rohre in Frage, die einseitig geschlossen sind. Die mit Luft gefüllten Rohre stehen am anderen Ende mit dem unter Druck stehenden Medium in Verbindung. Durch den Überdruck wird die Luftsäule komprimiert, und mit Hilfe einer geeichten Skala auf dem transparenten Rohr kann der Füllstand des Rohres festgestellt, und über den Füllstand des Rohres die Höhe des Überdrucks ermittelt werden. Mit Hilfe geeigneter lichtelektrischer Meßeinrichtungen kann der Überdruck mit Hilfe bekannter Speichereinrichtungen fortlaufend registriert werden.

Mit bekannten Vorrichtungen ist es technisch möglich, in Flüssigkeiten hydrostatische Drücke in Höhe von 100.000 bis 150.000 hPa (100–150 bar) zu erzeugen und in Druckbehältern langfristig aufrechtzuerhalten. Unter derart hohen Drücken können die wässrigen Konservierungslösungen auf Temperaturen von 250 Kelvin und darunter abgekühlt werden, ohne daß die Gefahr einer Eisbildung besteht.

Zum Kältekonservieren von roten Blutzellen werden diese vom Blut abgetrennt und in wässrigen Suspensionslösungen aufgeschwemmt. Eine solche Suspensionslösung kann beispielsweise 80 bis 95 Volumenanteile Blutzellen enthalten.

Für den Einsatz im Rahmen von Blutbank-Prozeduren empfiehlt es sich, Teilproben der kältekonservierten Suspensionslösungen in regelmäßigen Abständen während der Lagerzeit zu überprüfen, um den biochemisch-zellphysiologischen Erfolg zu kontrollieren. Zu diesem Zweck werden von der Suspensionslösung vor der Druck- und Kälteanwendung kleine Teilproben abgetrennt und diese Teilproben derselben Druck- und Kältebehandlung unterworfen. Die Überprüfung erfolgt dann anhand dieser Teilproben.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Konservieren von zellulären Blutkomponenten, insbesondere von Erythrozyten, durch Lagerung bei tiefen Temperaturen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zellulären Blutkomponenten nach ihrer Abtrennung vom Blut in einer wässrigen Konservierungslösung einem hohen hydrostatischen Druck ausgesetzt, unter diesem Druck auf eine Temperatur von weniger als 263 Kelvin abgekühlt und unter dem erhöhten Druck und bei dieser Temperatur gelagert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die die Blutzellen enthaltende und unter hohem hydrostatischen Druck stehende Konservierungslösung auf eine Temperatur von etwa 258 bis 243 Kel-

vin abgekühlt und bei dieser Temperatur gelagert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die die Blutkomponenten enthaltende Konservierungslösung einem hydrostatischen Druck von mehr als 20.000 hPa, und vorzugsweise von 80.000 bis 150.000 hPa, ausgesetzt und bei diesem Druck gelagert wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der wässrigen Konservierungslösung Na⁺-Ionen bis zu einer Konzentration von 1 bis 10 mMol/l zugesetzt werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der wässrigen Konservierungslösung Ca⁺⁺-Ionen bis zu einer Konzentration von 0,5 bis 5 µMol/l zugesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der wässrigen Konservierungslösung K⁺-Ionen bis zu einer Konzentration von mehr als 120 mMol/l zugesetzt werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der wässrigen Konservierungslösung Formänderungen der Blutzellen verhindernde Medikamente wie Chlopromazin oder Lokalanästhetika zugesetzt werden.

8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der die Blutzellen in der Konservierungslösung enthaltende Druckbehälter mit einer die Überwachung des Drucks gestattenden Druckmeßeinrichtung versehen ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Druckmeßeinrichtung aus einem transparenten, einseitig geschlossenen und mit Luft gefüllten und mit einer Skala versehenen Rohr besteht.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, **gekennzeichnet** durch eine die Höhe des Drucks in den Druckbehältern registrierende Speichereinrichtung.